

PCT

WELTORGÄNISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 49/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/47538 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/01001 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. April 1998 (02.04.98)	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 197 17 904.5 23. April 1997 (23.04.97) DE (71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE).	Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): LICHA, Kai [DE/DE]; Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE); RIEPKKE, Björn [DE/DE]; Weverstrasse 51, D-13595 Berlin (DE); SEMMLER, Wolfhard [DE/DE]; Jahnstrasse 17, D-13467 Berlin (DE); WRASIDLO, Wolfgang [DE/DE]; Knausstrasse 14, D-14193 Berlin (DE).		
(74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).		
(54) Title: ACID-LABILE AND ENZYMATICALY DIVISIBLE DYE COMPOUNDS FOR DIAGNOSIS WITH NEAR INFRARED LIGHT AND FOR THERAPY		
(54) Bezeichnung: SÄURELABILE UND ENZYMATISCH SPALTBARE FARBSTOFFKONSTRUKTE ZUR DIAGNOSTIK MIT NAHINFRAROTLICHT UND ZUR THERAPIE		
(57) Abstract		
The invention relates to acid-labile and enzymatically divisible compounds for in-vivo and in-vitro diagnosis by means of near infrared radiation (NIR-radiation), the use of said compounds as optic diagnostic and therapeutic agents, and the diagnostic agents containing said compounds.		
(57) Zusammenfassung		
Die Erfindung betrifft säurelabil und enzymatisch spaltbare Verbindungen zur In-vivo- und In-vitro-Diagnostik mittels Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung), die Verwendung dieser Verbindungen als optische Diagnostika und Therapeutika und diese Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel.		

AM3

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BY	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mall	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolci	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

„Säurelabile und enzymatisch spaltbare Farbstoffkonstrukte
zur Diagnostik mit Nahinfrarotlicht und zur Therapie“

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft säurelabile und enzymatisch spaltbare Verbindungen zur In-vivo- und In-vitro-Diagnostik mittels Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung), die Verwendung dieser Verbindungen als optische Diagnostika und Therapeutika und diese Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel.

15 Die Nahinfrarotbildgebung ist ein nicht invasives diagnostisches Verfahren, bei dem die hohe Durchlässigkeit biologischen Gewebes für Licht der Wellenlänge 650-1000 nm ausgenutzt wird. Im Gegensatz zu Licht des ultravioletten und sichtbaren Spektralbereichs, 20 das nur in die obersten Millimeter des Gewebes eindringen kann, werden bei Verwendung von Nahinfrarotlicht Eindringtiefen in Gewebe von bis zu mehreren Zentimetern erzielt. Die Ursachen für die prinzipiell geringe Eindringtiefe von Licht sind die Absorption körpereigener 25 Farbstoffe, hauptsächlich des Hämoglobins und des Wassers, die jedoch im Spektralbereich des Nahinfrarotlichtes zwischen 650 und 1000 nm minimale Werte aufweisen. Dieser spektrale Bereich der größten optischen Gewebetransparenz wird daher auch 30 diagnostisches/therapeutisches Fenster genannt (Boulnois, J., Lasers Med Sci 1986, 1:47-66). Dem Diagnostiker steht hiermit neben den modernen bildgebenden Verfahren, wie Röntgen, Magnetresonanztomographie oder Ultraschalldiagnostik, ein weiteres 35 Verfahren zur bildlichen Gewebedarstellung zur Verfügung (Haller, E.B., Time-resolved transillumination and optical tomography. J Biomed Optics 1996, 1:7-17).

Die Verwendung von NIR-Strahlung zur ortsabhängigen Aufzeichnung von Blutfluß und Oxygenierungsgrad im Gehirn von Säuglingen durch die Detektion der Absorption von Hämoglobin/Deoxyhämoglobin ist ein seit Jahren bekanntes und angewandtes Verfahren (Jöbsis, F.F., Science 1977, 198:1264-67; Chance, B., Leigh, J.S., Miyake, H. et al., Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85:4971-75; Benaron D.A. et al., Science 1993, 33: 369A.).

10 Das wesentliche Problem bei der Nutzung von nahinfraroter Strahlung ist die starke Streuung des Lichtes, so daß selbst bei unterschiedlichen photophysikalischen Eigenschaften von einem scharf begrenzten Objekt und seiner Umgebung sich dieses Objekt nur unscharf abzeichnet. Das

15 Problem nimmt mit wachsender Entfernung des Objektes von der Oberfläche zu und kann als hauptsächlicher limitie- render Faktor sowohl bei der Transillumination als auch bei der Detektion von Fluoreszenzstrahlung angesehen wer- den. Deshalb können Farbstoffe als Kontrastmittel, die

20 die optischen Eigenschaften der Gewebe prägen und zu einer erhöhten Absorption und Fluoreszenz der zu detektierenden Gewebe führen, auch bei geringer Ortsauflösung eine eindeutige Detektion ermöglichen.

Dabei kann das Absorptionsverhalten solcher

25 Farbstoffverbindungen als bildgebende Information ausgenutzt werden. Besitzen die Farbstoffe darüberhinaus die Eigenschaft, die absorbierte Energie als Fluoreszenzstrahlung zu emittieren, so kann diese ebenfalls als bildgebende Information genutzt werden.

30 Hierbei wird die gegenüber der Anregungsstrahlung rotverschobene Fluoreszenzstrahlung gesondert detektiert. Der Vorteil besteht u. a. darin, daß das Gewebe selbst im NIR-Bereich eine äußerst geringe Eigenfluoreszenz aufweist und somit der Untergrund minimal ist.

(S. Folli et al., Cancer Research 54, 2643-9 (1994); B. Ballou et al., Cancer Immunol. Immunother. 41, 257-63 (1995); X. Li et al., SPIE Vol. 2389, 789-98 (1995)).

5 In der Fluoreszenzdiagnostik ist die Voraussetzung dafür eine ausreichende, möglichst hohe Differenz in der Fluoreszenzemission zwischen zu detektierendem und umliegendem Gewebe. Dies kann prinzipiell durch eine Differenz in der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes
10 zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Substanzapplikation erreicht werden. Insbesondere für die Diagnostik in tieferen Gewebeschichten ist diese Differenz bei der Verwendung von Substanzen mit unspezifischem Anreicherungsverhalten oft nicht ausreichend.

15 Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, neue Verbindungen zur Verfügung zu stellen, welche die Nachteile des Standes der Technik überwinden.

20 Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



25 gelöst, worin

F für ein Farbstoffmolekül mit mindestens einem Absorptionsmaximum zwischen 600 und 1200 nm steht,

30 L für eine Linkerstruktur, welche eine säurelabile und/oder enzymatisch spaltbare Bindung enthält, steht,

m eine Zahl zwischen 1 und 80 ist,

wobei für den Fall, daß m eine Zahl zwischen 1 und 3 ist,

A ein Farbstoffmolekül mit mindestens einem
Absorptionsmaximum zwischen 600 und 1200 nm, ein
5 antibiotisch oder antizytostatisch wirksames
Molekül, ein Biomolekül, ein nicht biologisches
Makromolekül oder eine Verbindung B-(L-W)_m oder
D-(L-W)_m darstellt, wobei

10 D ein nicht biologisches Makromolekül ist,
B ein Biomolekül ist,
L die oben genannte Bedeutung hat,
W ein antibiotisch oder antizytostatisch wirksames
Molekül darstellt,
15 o eine Zahl zwischen 1 und 20 ist,

und wobei für den Fall, daß m eine Zahl zwischen 4 und 80
ist,

20 A ein Biomolekül, ein nicht biologisches Makromolekül
oder eine Verbindung B-(L-W)_m oder D-(L-W)_m
darstellt, wobei

D, B, L, W und o die oben genannten Bedeutungen haben.

25 Die besondere Eigenschaft hinsichtlich der In-vivo-Detektion der nahinfraroten Fluoreszenzemission der erfindungsgemäßen Verbindungen besteht darin, daß diese eine geringe bis gar keine Fluoreszenzemission aufweisen
30 und erst nach Spaltung dieses Konstruktus bzw. Abspaltung des Farbstoffes vom Konstrukt am Zielort (z. B. Tumor, Entzündungen) eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals auftritt. Die effektive Differenz des Fluoreszenzsignals zwischen zu detektierendem und umliegenden Gewebe wird
35 demzufolge durch

- a) die Konzentrationsdifferenz aufgrund pharmakokinetischer Mechanismen und
- b) durch die Differenz in der Fluoreszenzquantenausbeute zum Zeitpunkt der Diagnostik

5 geprägt.

Es wurde gefunden, daß die Fluoreszenz der Farbstoffe gequencht wird, wenn ein Farbstoffmolekül an ein weiteres Molekül (Dimere) unter Erhalt der erfindungsgemäßen Verbindungen gekoppelt ist, d. h. es tritt eine äußerst geringe Fluoreszenzemission im Vergleich zum entsprechenden Farbstoffmolekül im ungebundenen Zustand auf. Es wurde darüberhinaus gefunden, daß ein vergleichbares Quenching auftritt, wenn andere Moleküle mit aromatischen Strukturen, welche sowohl Farbstoffe als auch Wirkstoffe (z. B. Zytostatika oder Antibiotika) sein können, mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Überraschenderweise tritt ebenso ein Quenching bei Kopplung der Farbstoffe an Antikörper, Antikörperfragmente und Proteine auf.

Grundsätzlich müssen sich die Farbstoffe, die struktureller Bestandteil der erfindungsgemäßen Verbindungen sind, in ihrer monomeren unkonjuguierten Form durch hohe molare Absorptionskoeffizienten und hohe Fluoreszenzquantenausbeuten auszeichnen.

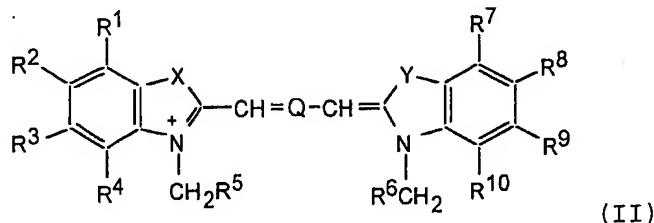
Bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen
Formel I zeichnen sich dadurch aus, daß F und/oder A für
5 einen

10 Polymethinfarbstoff, Tetrapyrrolfarbstoff,
Tetraazapyrrolfarbstoff, Xanthinfarbstoff,
Phenoxazinfarbstoff oder Phenothiazinfarbstoff
stehen.

Besonders bevorzugt sind die Strukturen aus der Klasse
der Polymethinfarbstoffe, da diese Absorptionsmaxima mit
sehr hohen molaren Absorptionskoeffizienten im
15 nahinfraroten Spektralbereich zwischen 700 und 1000 nm
aufweisen (ϵ bis zu $300000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), wie
beispielsweise Cyaninfarbstoffe, Squariliumfarbstoffe und
Croconiumfarbstoffe, sowie Merocyanin- und
Oxonolfarbstoffe.

20 Ferner sind solche erfindungsgemäßen Verbindungen der
allgemeinen Formel (I) bevorzugt, bei denen F und/oder A
für einen

25 Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel II



30 stehen,
worin

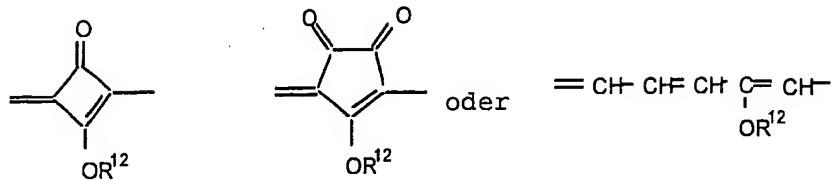
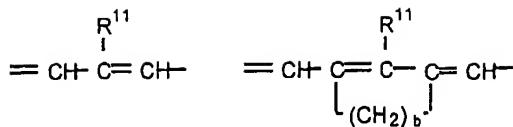
R¹ bis R⁴ und R⁷ bis R¹⁰ unabhängig voneinander für ein Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatom oder eine Nitrogruppe oder für einen Rest -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹, -E¹,

wobei E¹ und E² unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C₁-C₅₀-Alkylkette, wobei die Kette oder Teile dieser Kette gegenbenenfalls eine oder mehrere aromatische oder gesättigte zyklische C₅-C₆- oder bizarre C₁₀-Einheiten formen können, steht, und wobei die C₁-C₅₀-Alkylkette von 0 bis 15 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 3 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen, 0 bis 5 Estergruppen, 0 bis 3 Carbongruppen, 0 bis 3 Aminogruppen, substituiert ist,

und wobei jeweils benachbarte Reste R₁ - R₄ und/oder R₇ - R₁₀ unter Bildung eines sechsgliedrigen aromatischen Kohlenstoffringes miteinander verknüpft sein können,
R⁵ und R⁶ unabhängig voneinander für einen Rest -E¹ mit der oben angegebenen Bedeutung oder für eine C₁-C₄-Sulfoalkylkette stehen,

und/oder R¹ bis R¹⁰ für eine Verknüpfung mit L stehen,

Q ein Fragment



ist,

worin

R¹¹ für ein Wasserstoff-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatom oder eine Nitrogruppe oder einen Rest -NE¹E², -OE¹ oder -E¹, wobei E¹ und E² die oben angegebene Bedeutung haben oder für eine Verknüpfung mit L steht,

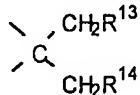
10

R^{12} für ein Wasserstoffatom oder einen Rest E^1 mit der oben angegebenen Bedeutung steht,

b eine Zahl 0, 2 oder 3 bedeutet,

15

X und Y unabhängig voneinander O, S, -CH=CH- oder ein Fragment



20

darstellt,

worin

25

R¹³ und R¹⁴ unabhängig voneinander für Wasserstoff, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C₁ - C₁₀-Alkylkette, die durch bis zu 5 Sauerstoffatome unterbrochen und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert

sein kann, stehen, und wobei die Reste R¹³ und R¹⁴ unter Ausbildung eines 5- oder 6-gliedrigen Ringes miteinander verknüpft sein können.

5 Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I), in denen Farbstoffe mit einem therapeutisch wirksamen Molekül über eine physiologisch spaltbare Bindung verknüpft sind, oder Farbstoff und Wirkstoff über physiologisch spaltbare Bindungen an
10 Biomoleküle oder nicht biologische Trägermoleküle gekoppelt sind.

Besonders bevorzugt sind Konstrukte, bei denen die Fluoreszenz des Farbstoffes im gekoppelten Zustand 15 gequencht und die therapeutische Aktivität des Wirkmoleküls durch die Kopplung an Farbstoff bzw. Trägermolekül maskiert ist (Pro-Drug-Effekt). Die Spaltung der Bindung führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenzemission bei gleichzeitiger Freisetzung der 20 Aktivität des Wirkstoffes.

Wirkstoffe W und/oder A in der erfindungsgemäßen allgemeinen Formel (I) sind beispielsweise die im folgenden aufgeführten Verbindungen:

25 Antibiotika: Aclacinomycin, Actinomycin F₁, Anthramycin, Azaserin, Bleomycine, Cactinomycin, Carubicin, Carzinophilin, Chromomycine, Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin, Mtiomycin, Mycophenolsäure,
30 Nogalamycin, Olivomycine, Peplomycin, Plicamycin, Porfiromycin, Puromycin, Streptonigrin, Tubercidin, Zorubicin,
Folsäure-Analoga: Denopterin, Metothrexat, Pteropterin, Trimetrexat,

Pyrimidin-Analoga: Ancitabin, Azacitidin, 6-Azauridin,
Carmofur, Cytarabin, Doxifluridin, Enocitabin,
Floxuridin, 5-Fluor-Uracil,
Purin-Analoga: Fludarabin, 6-Mercaptopurin, Thiamiprin,
5 Thioguanin und Derivate der genannten Verbindungen,
alkylierende Substanzen: Alkylsulfonate, Aziridine,
Ethylenimine, Methylmelamine, Nitroharnstoffe,
Stickstofflostverbindungen,
hormonell wirksame Substanzen wie Androgene,
10 Antiadrenale, Antiandrogene, Antiestrogene, Estrogene,
LH-RH-Analoga und Progestogene,
sowie weitere zytostatisch wirksame Substanzen, wie Taxol
und Taxol-Derivate.

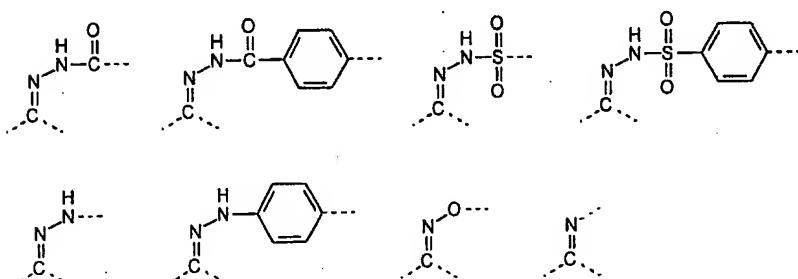
15 Weitere Wirkstoffe sind photodynamisch aktive Substanzen,
die sich durch das Vermögen auszeichnen, nach Anregung
eine photosensibilisierende Wirkung durch Bildung
zytotoxischen Singuletsauerstoffs und von Radikalen
entfalten. Solche Verbindungen sind in erster Linie
20 Tetrapyrrole bzw. Tetraazapyrrole, beispielsweise
Porphyrine, Benzoporphyrine, Chlorine, Purpurine,
Phthalocyanine, Naphthalocyanine und Derivate der
genannten Verbindungen. Weitere Verbindungen sind
expandierte Porphyrine, Porphycene und Oxazin- bzw.
25 Phenoxazinfarbstoffe.

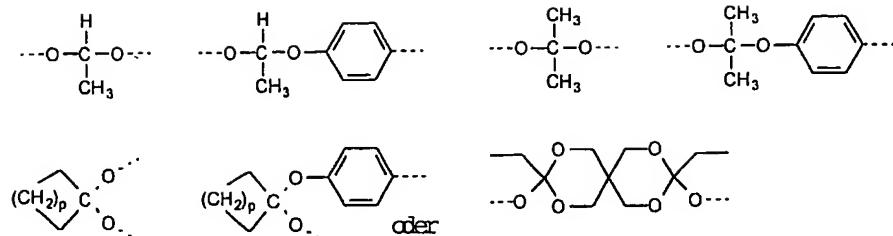
Die chemische Bindung, die gemäß der allgemeinen Formel
(I) in der Linkerstruktur L enthalten ist, ist
strukturell derart beschaffen, daß diese bei bestimmten
30 physiologischen Parametern, durch die erkrankte Gewebe
(Tumoren) charakterisiert sind und welche sich von
normalen Gewebebereichen unterscheiden, gespalten wird.

Es ist in der Literatur beschrieben, daß Tumore durch
35 geringere pH-Werte im Vergleich zu Normalgewebe
charakterisiert sind. Während der intrazelluläre pH-Wert

weitgehend identisch ist (ca. pH 7.4) ist der extrazelluläre pH-Wert in Tumoren um bis zu 0.5 pH-Einheiten erniedrigt. Auch Entzündungen, insbesondere bakterieller Art, sind durch erniedrigte pH-Werte gekennzeichnet. Die Methoden zur Bestimmung der pH-Werte sind u. a. Messungen mit Mikroelektroden, Fluoreszenzmessungen mit pH-sensitiven Fluoreszenzproben und Messungen mit MR-Sonden (R. J. Gillies et al., Am. J. Physiol. 267, pC 195-203 (1994),
 5 G. R. Martin und R. K. Jain, Microvascular Research 46, 216-230 (1993),
 L. E. Gerweck und K. Seetharaman, Cancer Research 56, 1194-1198 (1996)),
 K. Engin et al., Int. J. Hyperthermia 11(1995) 211-216,
 10 K. Engin et al., Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.
 15 29 (1994) 125-132,
 G. Helmlinger et al., Nature Medicine 3 (1997) 177-182.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher Verbindungen
 20 mit Linkerstrukturen L, die durch erniedrigte physiologische pH-Werte gespalten werden. Solche Strukturen sind beispielsweise Alkylhydrazone, Acylhydrazone, Arylhydrazone, Sulfonylhydrazone, Imine, Oxime, Acetale, Ketale, Orthoester entsprechend den
 25 Fragmenten





worin p für eine Zahl zwischen 2 und 4 steht.

5 Die Spaltung der erfindungsgemäßen Verbindungen kann neben der Spaltung aufgrund erniedrigter pH-Werte auch durch Enzyme, die in den zu detektierenden Geweben (z. B. Tumoren, bakterielle Entzündungen) in erhöhter Konzentration vorliegen, erfolgen.

10 Weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher Verbindungen mit Linkerstrukturen L, die enzymatisch gespalten werden. Enzymatisch spaltbare Linkerstrukturen sind beispielsweise solche, die durch Kathepsine, Peptidasen, Carboxypeptidasen, α - und β -Glukosidasen, Lipasen, Oxidasen, Phospholipasen, Phosphatasen, Phosphodiesterasen, Proteasen, Elastasen, Sulfatasen, Reduktasen, Transferasen und bakterielle Enzyme, beispielsweise Penicillin-Amidasen sowie β -Lactamasen, gespalten werden (P. D. Senter et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995), 389-94).

25 Bevorzugte enzymatisch spaltbare Strukturen sind kurzkettige Peptidsequenzen, wie beispielsweise Sequenzen, die die Aminosäuresequenz Val-Leu-Lys enthalten.

30 Die Kinetik, die zu einer Anreicherung im zu detektierenden Gewebe bzw. zu einem entsprechenden Konzentrationsgradienten zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Applikation führt, muß sowohl mit der Kinetik der

Spaltung der erfindungsgemäßen Verbindungen als auch der Kinetik des Abtransportes des freigesetzten Farbstoffmoleküls korrelieren und zu einem synergistischen Effekt führen.

5

Weitere bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zeichnen sich dadurch aus, daß A und/oder B für einen Antikörper, deren Konjugate und Fragmente, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, natürliche oder synthetische Ribonukleinsäuren oder Desoxyribonukleinsäuren oder deren chemische Modifikationen, wie Aptamere oder Antisenseoligonukleotide, Lipoproteine, Lectine, Kohlenhydrate, Mono-, Di- oder Trisaccharide, lineare oder verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder -saccharidderivate oder für ein Dextran steht.

Ferner sind die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) bevorzugt, in denen D Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Polylysin oder Polylysin-Dendrimere oder deren Derivate darstellen.

Die Verknüpfung der Strukturelemente A, D, B, L und W erfolgt entweder direkt oder über übliche funktionelle Gruppen. Solche Gruppen sind beispielsweise Ester, Ether, sekundäre und tertiäre Amine, Amide, Thioharnstoff-, Harnstoff-, Carbamatgruppen oder Maleimidostrukturen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I zur In-vivo-Diagnostik erkrankter Gewebebereiche mittels NIR-Strahlung sowie zur Therapie erkrankter Gewebebereiche.

35 Gegenstand der Erfindung ist ferner ein optisches Diagnostikum zur In-vivo-Diagnostik erkrankter

Gewebebereiche mittels NIR-Strahlung, welches mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthält.

5 Diese Mittel werden nach den dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt, ggf. unter Verwendung üblicher Hilfs- und/oder Trägerstoffe sowie Verdünnungsmittel und dergleichen. Dazu gehören physiologisch verträgliche Elektrolyte, Puffer, Detergenzien und Substanzen zur
10 Anpassung der Osmolarität sowie zur Verbesserung der Stabilität und Löslichkeit. Durch die in der Pharmazie gebräuchlichen Maßnahmen ist für die Sterilität der Zubereitungen bei der Herstellung und insbesondere vor der Applikation zu sorgen.

15 Die Synthese der Farbstoffe F und A erfolgt nach literaturbekannten Methoden, z. B.

F.M. Hamer in The Cyanine Dyes and Related Compounds,
20 John Wiley and Sons, New York, 1964;
J. Fabian et al., Chem. Rev. 92 (1992) 1197;
L.A. Ernst et al., Cytometrie 10 (1989) 3-10;
P.L. Southwick et al., Cytometrie 11 (1990) 418-430;
R. B. Mujumdar et al., Bioconjugate Chem. 4 (1993) 105-11;
25 E. Terpetschnig et al., Anal. Biochem. 217 (1994) 197-204;
J. S. Lindsey et al., Tetrahedron 45 (1989) 4845-66,
EP-0591820 A1;
L. Strekowski et al., J. Heterocycl. Chem. 33 (1996)
1685-1688;
30 S. R. Mujumdar et al., Bioconjugate Chem. 7 (1996) 356-
362;
M. Lipowska et al., Synth. Commun. 23 (1993) 3087-94;
E. Terpetschnig et al., Anal. Chim. Acta 282 (1993) 633-
641;

M. Matsuoka und T. Kitao, Dyes Pigm. 10 (1988) 13-22 und
N. Narayanan und G. Patronay, I. Org. Chem. 60 (1995)
2361-95.

5 Die Farbstoffe werden in Anlehnung an literaturbekannte Methoden mit Substituenten synthetisiert, die säurelabile oder enzymatisch spaltbare Bindungen enthalten oder aus denen solche Bindungen nach Kopplung entstehen; z. B. nach

10 B. M. Mueller et al., Bioconjugate Chem. 1 (1990) 325-330;
K. Srinivasachar und D. M. Neville, Biochemistry 28 (1989) 2501-09;
15 D. M. Neville et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 14653-61;
T. Kaneko et al., Bioconjugate Chem. 2 (1991), 133-41;
B. A. Froesch et al., Cancer Immunol. Immunother. 42 (1996), 55-63 und
J. V. Crivello et al., J. Polymer Sci: Part A: Polymer
20 Chem. 34 (1996) 3091-3102.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

Beispiele:

25

1. Synthese von 5-(1-Oxoethyl)-1,1'-(4-sulfobutyl)-indotricarbocyanin-natriumsalz 1 (Figur 1)

30

4-Hydrazinophenylmethylketon wird aus 4-Aminophenylmethylketon durch Diazotierung und Reduktion mit SnCl₂ synthetisiert (in Anlehnung an T. Górecki et al., J. Heterocyclic Chem. 33 (1996) 1871-76).

35

4,8 g (32 mmol) 4-Hydrazinophenylmethylketon, 5,4 g Natriumacetat und 3,9 g (45 mmol) 3-Methyl-2-butanon werden in 40 ml Essigsäure 1 h bei Raumtemperatur und 4 h bei 120°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird im Vakuum

eingedampft, in 300 ml Dichlormethan aufgenommen und die organische Phase mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ erhält man 7,5 g eines braunen Öls. Dieses wird mit 6,5 g (48 mmol) 1,4-Butansulton 5 h auf 5 140°C erhitzt, nach dem Abkühlen mit Aceton verrührt und der ausgefallene Feststoff chromatographisch (RP C-18, Laufmittel Methanol/Wasser) gereinigt. Ausbeute: 2,5 g (23%) 5-(1-Oxoethyl)-1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin **2**.

10 Zur Darstellung des Farbstoffes **1** werden 0,5 g (1,7 mmol) 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin **3** mit 0,47 g (1,6 mmol) Glutaconaldehyddianilhydrochlorid in 10 ml Essigsäureanhydrid 30 min bei 120°C gerührt. Nach Abkühlen wird mit 0,6 g (1,8 mmol) **2**, 10 ml 15 Essigsäureanhydrid, 4 ml Essigsäure und 0,5 g Natriumacetat versetzt und 30 min auf 120°C erhitzt. Die tiefblaue Lösung wird abgekühlt, mit 200 ml Ether verrührt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Nach chromatographischer Reinigung (RP C-18, Laufmittel 20 Methanol/Wasser) und Gefriertrocknung erhält man 0,3 g (26%) Produkt **1**.

Elementaranalyse:

Ber.: C 61,99 H 6,33 N 3,91 S 8,95
25 Gef.: C 61,73 H 6,49 N 3,80 S 8,78

Absorption: λ_{max} (H₂O) = 748 nm ($\epsilon = 148000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

30 2. Modifizierung mit säurelabilen Linkern (Figur 2)

2.1. Umsetzung von **1** mit 4-Carboxyphenylsulfonylhydrazin
35 0,2 g (0,28 mmol) **1** und 74 mg (0,34 mmol) 4-Carboxyphenylsulfonylhydrazin werden in 20 ml Methanol gelöst, mit 5 µl Trifluoressigsäure versetzt und 18 h bei Raum-

temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum verdampft, der Rückstand mehrfach mit Dichlormethan gewaschen und das Produkt getrocknet. Ausbeute: 0,21 g 4.

5 2.2. Umsetzung von 1 mit 4-Aminobenzoësäurehydrazid

0,2 g (0,28 mmol) 1 und 51 mg (0,34 mmol) 4-Aminobenzoësäurehydrazid werden analog 2.1 umgesetzt. Ausbeute: 0,20 g 5.

10 2.3. Umsetzung von 1 mit 4-(Aminomethyl)benzoësäurehydrazid

0,2 g (0,28 mmol) 1 und 56 mg (0,34 mmol) 4-Aminomethylbenzoësäurehydrazid werden analog 2.1 umgesetzt. Ausbeute: 0,22 g 6.

20 3. Erzeugung reaktiver funktioneller Gruppen
(N-Hydroxysuccinimidester und Isothiocyanat) (Figur 2)

Zur Darstellung der entsprechenden N-Hydroxysuccinimidylesterverbindung 7 werden 0,1 g (0,1 mmol) 4 mit 14 mg (0,12 mmol) N-Hydroxysuccinimid (NHS) in 12 ml Dimethylformamid (DMF) vorgelegt und bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 23 mg (0,11 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 1 ml DMF versetzt. Nach 72 h Röhren wird das Produkt durch mit Diethylether ausgefällt, abfiltriert und erneut aus DMF/Diethylether umgefällt. Das nach Vakuumtrocknung erhaltene Produkt (12 mg) wird ohne weitere Reinigung verwendet.

Zur Darstellung der säurelabilen Isothiocyanatverbindung 8 werden 0,1 g (0,11 mmol) 5, 33 mg (0,14 mmol) N,N'-Thiocarbonyldi-2(1H)-pyridon und 15 mg (0,15 mmol) Triethylamin in 15 ml Chloroform 60 min. bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wird mit Diethylether

ausgefällt, abfiltriert und mittels HPLC gereinigt (RP Select B, Merck, Laufmittel 10mM Phosphatpuffer pH8 / Methanol). Man erhält 40 mg (40%) 8 nach Gefriertrocknung, Abtrennung der Salze mit 5 Dichlormethan/Methanol und Trocknung im Vakuum.

4. Labeling von mAK 9.2.27 (Anti-Melanom-Antikörper)

10 4.1. Labeling mit säurelabilem NHS-Ester 7

1 mg Antikörper in 0,5 ml 50mM Boratpuffer (pH 9,2) wird mit 33 µl 7 (Stammlösung 5 mmol/l in DMF) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Ungebundener Farbstoff 15 wird über NAP-5-Säulen abgetrennt (Elution mit 25 mM Phosphatpuffer pH 7,8, +0,01% NaN₃). Das Produkt mAK9.2.27/4-Konjugat wird in Lösung bei 4°C aufbewahrt.

20 VIS/NIR-Absorptionspektrum von mAK9.2.27/4-Konjugat (in Phosphatpuffer pH 7,8) siehe Figur 5.

Fluoreszenzquantenausbeute Q = 0,1 % (5 µmol/l in Phosphatpuffer pH 7,8; bezogen auf Indocyaningrün als

25

30

35

Standard mit Q = 13 % in DMSO nach R.C. Benson und H.A. Kues, J. of Chemical and Engineering Data 22 (1977) 379)

5 4.2. Labeling mit säurelabilem Isothiocyanat **8**

1 mg Antikörper in 0,5 ml 50mM Boratpuffer (pH 9,2) wird mit 6 µl **8** (Stammlösung 5 mmol/l in DMF) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Ungebundener Farbstoff wird über NAP-5-Säulen abgetrennt (Elution mit 25 mM Phosphatpuffer pH 7,4, +0,01% NaN₃). Das Produkt mAK9.2.27/5-Konjugat wird in Lösung bei 4°C aufbewahrt.

15 5. Synthese von dimeren Indotricarbocyaninfarbstoffen

5.1. Darstellung des symmetrischen Spirodimers **10**
(Figur 3)

20 0,1 g (0,47 mmol) 3,9-Diethyliden-2,4,8,10-tetraoxaspiro-[5.5]undecan (nach M. Crivello et al., J. Polymer Sci.: Part A: Polymer Chem. 34 (1996) 3091-3102 synthetisiert) und 0,11 g (0,94 mmol) 6-Amino-1-hexanol werden in 15 ml Diethylether 24 h bei Raumtemperatur gerührt und das
25 Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wird an der Ölpumpe getrocknet und ohne weitere Reinigung umgesetzt.
0,2 g (0,28 mmol) 5-Carboxy-bis-1,1'-(4-sulfobutyl)-indotricarbocyanin-natriumsalz **9** werden in 15 ml Dichlormethan zusammen mit 0,09 g (0,28 mmol) TBTU und 30 mg Triethylamin 30 min gerührt und mit 0,06 g (0,14 mmol) o. g. Spiroverbindung in 2 ml Dichlormethan versetzt.
30 Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wird das Produkt mit Diethylether ausgefällt und chromatographisch gereinigt
35 (RP C-18, Laufmittel Methanol/10 mM Phosphatpuffer pH 8). Nach Gefriertrocknung werden die Salze mit

Methanol/Dichlormethan ausgefällt. Man erhält 68 mg (26%) Produkt **10**.

5 VIS/NIR-Absorptionspektrum von **10** (5 µmol/l in Phophatpuffer pH 8) siehe Figur 6.

Fluoreszenzquantenausbeute Q = 0,2 % (5 µmol/l in Phophatpuffer pH 8; bezogen auf Indocyaningrün als Standard, siehe Beispiel 4.1.).

10

5.2. Darstellung eines Farbstoffdimers (**11**) mit säurelabilem Hydrazonlinker aus **6** (Figur 4)

15 0,1 g (0,14 mmol) 5-Carboxy-bis-1,1'-(4-sulfobutyl)-indotricarbocyanin-natriumsalz **9** werden in 10 ml DMF zusammen mit 45 mg (0,14 mmol) TBTU und 15 mg Triethylamin 30 min gerührt und mit 0,14 g (0,16 mmol) **6** in 2 ml DMF versetzt. Nach 5 h Röhren bei Raumtemperatur 20 wird das Produkt durch Zugabe von Diethylether auskristallisiert, abfiltriert und chromatographisch gereinigt (RP C-18, Laufmittel Methanol / 10 mM Phosphatpuffer pH 8). Nach Gefriertrocknung werden die Salze mit Methanol/Dichlormethan ausgefällt. Man erhält 25 0,13 g (59%) **11**.

VIS/NIR-Absorptionspektrum von 11 (4 $\mu\text{mol/l}$) in Phosphatpuffer pH 8,0 und in Phosphatpuffer pH 6,0 nach 24 h bei 37°C: siehe Figur 7.

5

6. Messung der Fluoreszenzquantenausbeute von 11 bei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit von der Zeit

10 Lösungen der Konzentrationen 4 $\mu\text{mol/l}$ in 50 mM Phosphatpuffer der pH-Werte 7,4; 7,0; 6,6; 6,0 und 5,0 werden bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden Aliquots entnommen und die Fluoreszenzquantenausbeuten bestimmt (SPEX Fluorolog Spektralfluorometer, 15 400 W Xe-Lampe, PM958-Detektor, kalibriert auf wellenlängenabhängige Empfindlichkeit des Detektors, Werte bezogen auf Indocyaningrün, siehe Beispiel 4.1.).

20

25

30

35

Die Beobachtung der Spaltung des säurelabilen Dimers **11** anhand des Anstiegs Fluoreszenzquantenausbeute bei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit von der Zeit ist
5 in Figur 8 gezeigt.

7. Synthese eines Doxorubicin-Indotricarbocyanin-Konjugates (**13**) mit säurelabilem Hydrazonlinker (Figur 4)

10

20 mg (34 μmol) Doxorubicin-hydrochlorid und 11 mg (68 μmol) 4-(Aminomethyl)benzoësäurehydrazid werden in 3 ml wasserfreiem Methanol nach Zugabe von 2 μl Trifluoressigsäure 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das
15 Produkt **12** wird mit Acetonitril auskristalliert, abzentrifugiert, mit Acetonitril gewaschen und getrocknet, Ausbeute 18 mg (24 μmol) Rohprodukt.
14 mg (20 μmol) 5-Carboxy-bis-1,1'-(4-sulfobutyl)-indotricarbocyanin-natriumsalz **9** werden in 0,5 ml DMF zusammen mit 7 mg (22 μmol) TBTU und 20 μl Triethylamin
20 30 min gerührt. Dieses Reaktionsgemisch wird tropfenweise bei 0°C zu einer Lösung von o. g. **12** (18 mg in 0,2 ml DMF) gegeben und 3 h bei 0°C gerührt. Das Produkt wird durch Zugabe von Diethylether ausgefällt und analog

25

Beispiel 5 chromatographisch gereinigt. Man erhält 12 mg
(47%) **13**.

Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel I

5

$$(F-L)_m-A \quad (I)$$

worin

10 F für ein Farbstoffmolekül mit mindestens einem
Absorptionsmaximum zwischen 600 und 1200 nm
steht,

15 L für eine Linkerstruktur, welche eine säurelabile
und/oder enzymatisch spaltbare Bindung enthält,
steht,

m eine Zahl zwischen 1 und 80 ist,

20 wobei für den Fall, daß m eine Zahl zwischen 1
und 3 ist,

25 A ein Farbstoffmolekül mit mindestens einem
Absorptionsmaximum zwischen 600 und 1200 nm, ein
antibiotisch oder antizytostatisch wirksames
Molekül, ein Biomolekül, ein nicht biologisches
Makromolekül oder eine Verbindung B-(L-W)_o oder
D-(L-W)_o darstellt, wobei

30 D ein nicht biologisches Makromolekül ist,

B ein Biomolekül ist,

L die oben genannte Bedeutung hat,

W ein antibiotisch oder antizytostatisch wirksames
Molekül darstellt,

35 o eine Zahl zwischen 1 und 20 ist,

und wobei für den Fall, daß m eine Zahl zwischen 4 und 80 ist,

5 A ein Biomolekül, ein nicht biologisches Makromolekül oder eine Verbindung B-(L-W)_o oder D-(L-W)_o darstellt, wobei

D, B, L, W und o die oben genannten Bedeutungen haben.

10

2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in den allgemeinen Formeln (I) F und/oder A für einen Polymethinfarbstoff, Tetrapyrrolfarbstoff, Tetraazapyrrolfarbstoff, Xanthinfarbstoff, Phenoxazinfarbstoff oder Phenothiazinfarbstoff stehen.

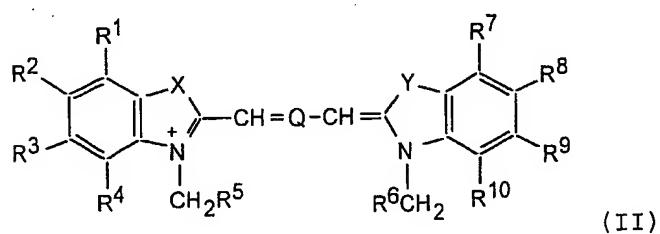
15

3. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) F und/oder A für einen Cyanin-, Squarilium-, Croconium-, Merocyanin- oder Oxonolfarbstoff stehen.

20

4. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) F und/oder A für einen Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel (II)

25



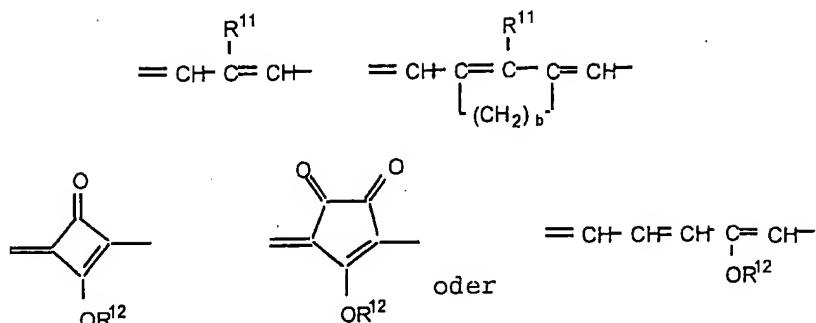
30

stehen,

worin

R¹ bis R⁴ und R⁷ bis R¹⁰ unabhängig voneinander für
ein Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatom oder eine Nitro-
5 gruppe oder für einen Rest -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹,
-NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹,
-E¹,
wobei E¹ und E² unabhängig voneinander für ein
Wasserstoffatom, eine gesättigte oder ungesät-
10 tigte, verzweigte oder geradkettige C₁-C₅₀-Alkyl-
kette, wobei die Kette oder Teile dieser Kette
gegebenenfalls eine oder mehrere aromatische
oder gesättigte zyklische C₅-C₆- oder bizyklische
C₁₀-Einheiten formen können, steht, und wobei die
15 C₁-C₅₀-Alkylkette von 0 bis 15 Sauerstoffatomen
und/oder von 0 bis 3 Carbonylgruppen unterbrochen
ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen, 0 bis 5
Estergruppen, 0 bis 3 Carboxygruppen bzw. 0 bis 3
Aminogruppen substituiert ist,
20 und wobei jeweils benachbarte Reste R₁ - R₄ und/oder
R₇ - R₁₀ unter Bildung eines sechsgliedrigen
aromatischen Kohlenstoffringes miteinander verknüpft
sein können,
R⁵ und R⁶ unabhängig voneinander für einen Rest -E¹
25 mit der oben angegebenen Bedeutung oder für eine C₁-
C₄-Sulfoalkylkette stehen,
und/oder R¹ bis R¹⁰ für eine Verknüpfung mit L stehen,

Q ein Fragment



ist.

worin

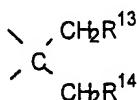
5 R¹¹ für ein Wasserstoff-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatom oder eine Nitrogruppe oder einen Rest -NE¹E², -OE¹ oder -E¹, wobei E¹ und E² die oben angegebene Bedeutung haben oder für eine Verknüpfung mit L steht,

10 R¹² für ein Wasserstoffatom oder einen Rest E¹
mit der oben angegebenen Bedeutung steht,

h eine Zahl 0, 2 oder 3 bedeutet,

15

X und Y unabhängig voneinander Reste O, S, -CH=CH- oder ein Fragment



20 darstellen,

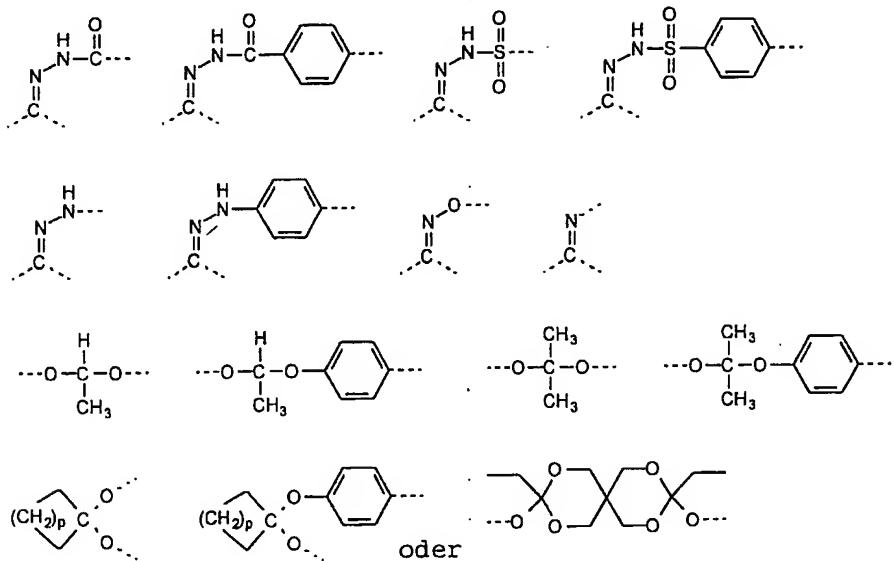
worin

25 R¹³ und R¹⁴ unabhängig voneinander für Wasser-
stoff, eine gesättigte oder ungesättigte, ver-
zweigte oder geradkettige C₁ - C₁₀-Alkylkette,
die durch bis zu 5 Sauerstoffatome unterbrochen
und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert
sein kann, stehen, und wobei die Reste R¹³ und

R^{14} unter Ausbildung eines 5- oder 6-gliedrigen Ringes miteinander verknüpft sein können.

5 5. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) W oder A für Antibiotika, Folsäure-Analoga, Pyrimidin-Analoga, Purin-Analoga, hormonell wirksame Substanzen sowie weitere 10 cytostatisch wirksame Substanzen stehen.

6. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) L für eine Struktur steht, welche ein säurelabiles Fragment 15



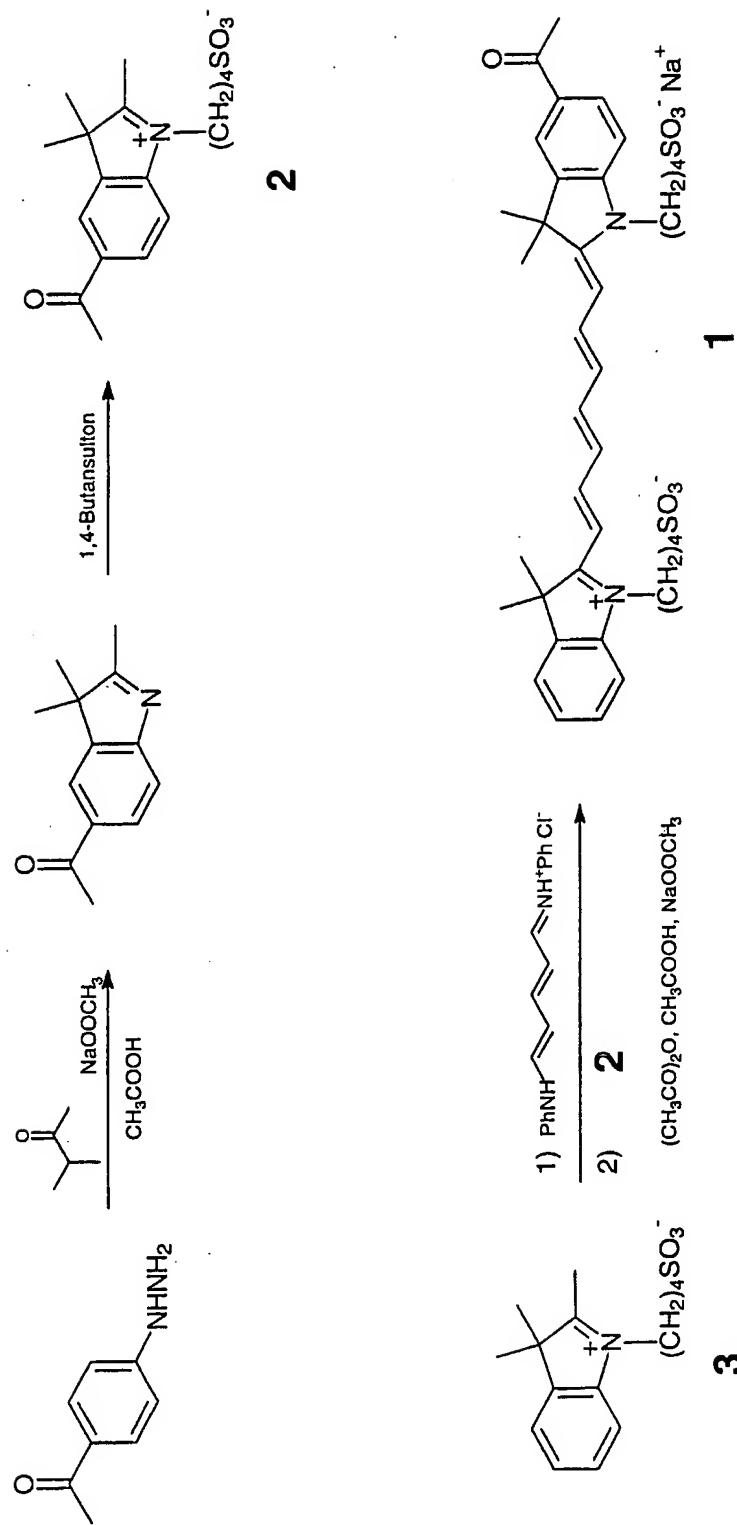
20 worin p für eine Zahl zwischen 2 und 4 steht, enthält.

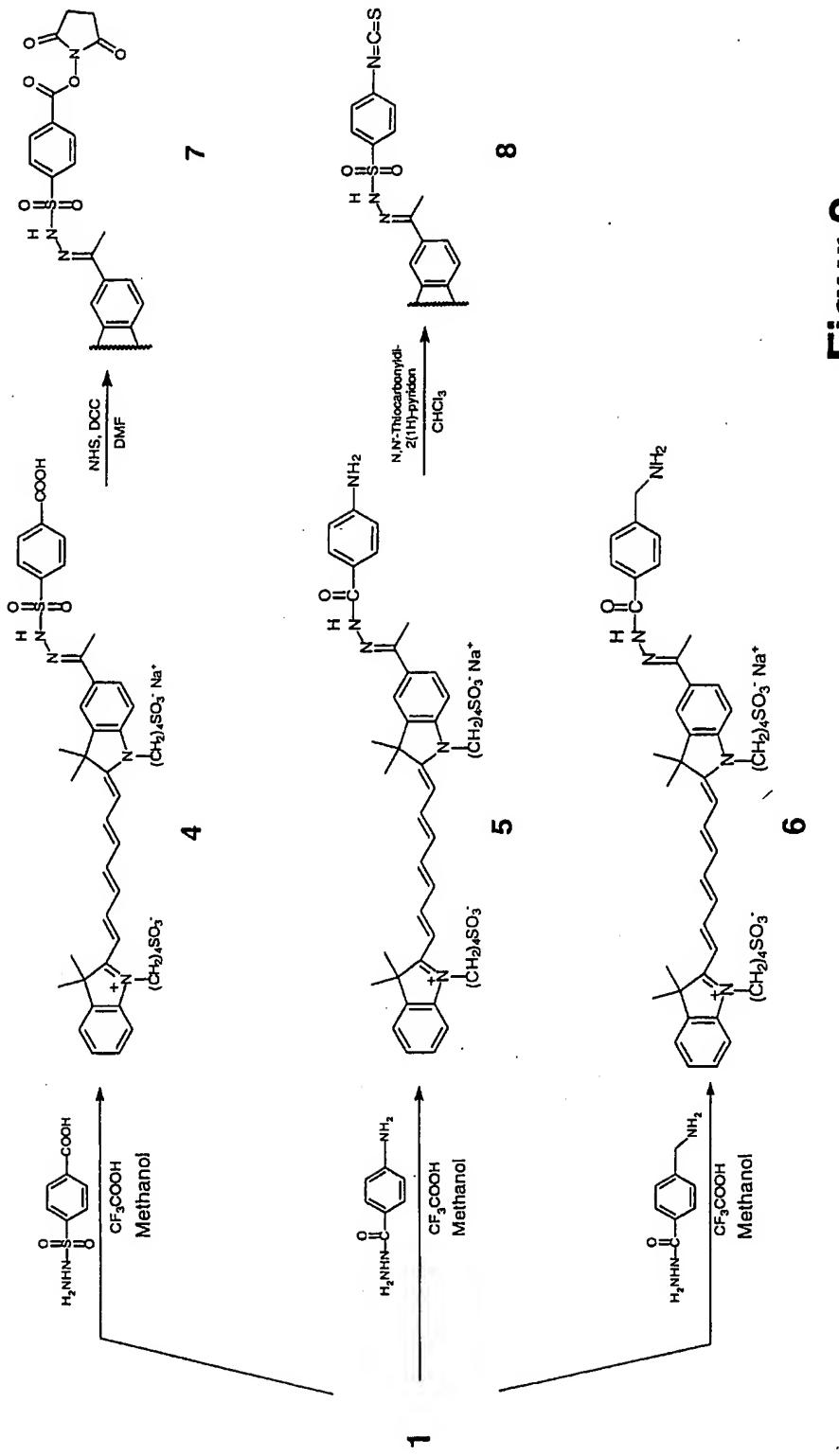
7. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) L für eine Struktur steht,

welche eine enzymatisch spaltbare chemische Bindung enthält.

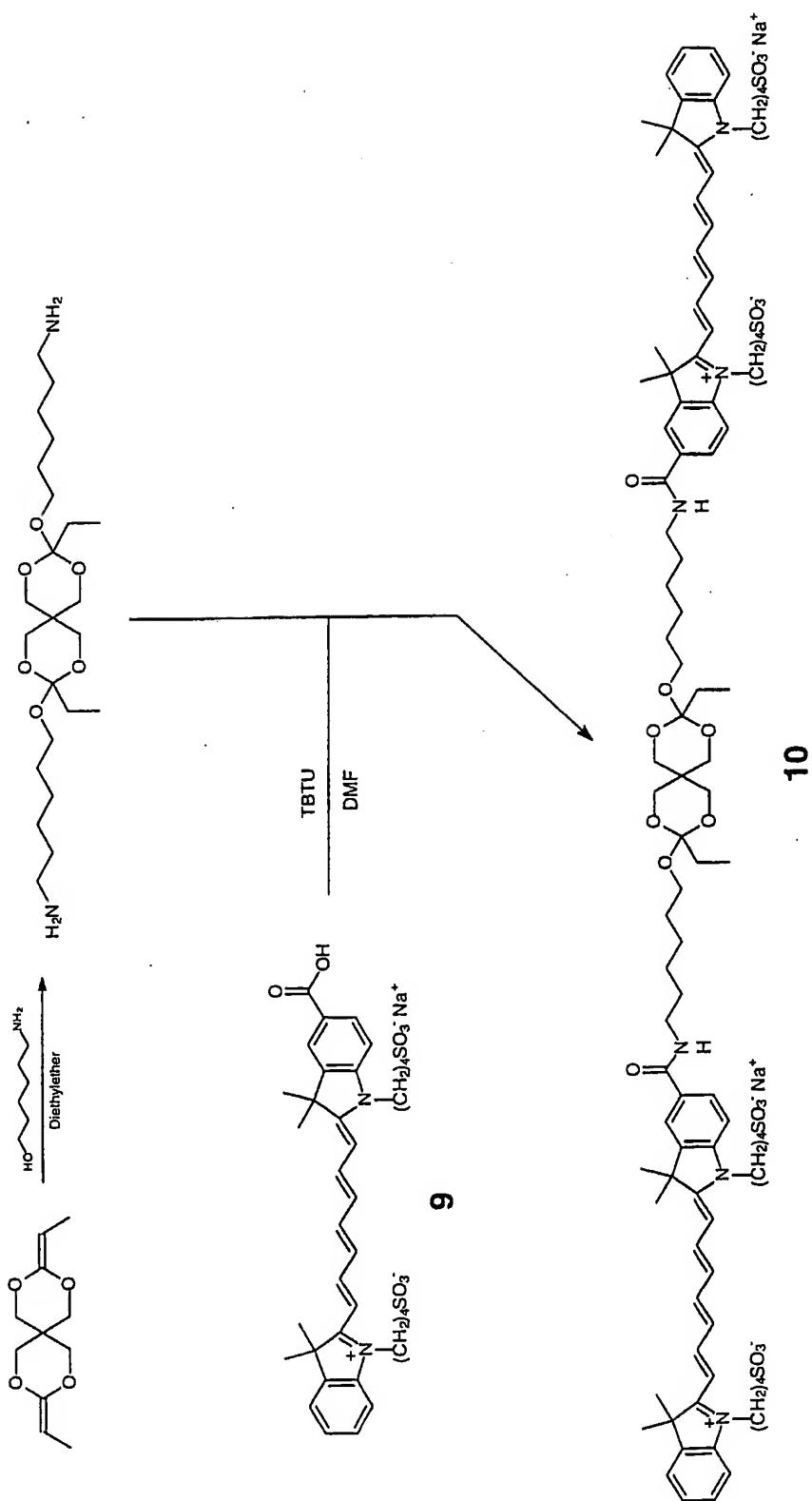
8. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) L für eine Struktur steht, die durch Kathepsine, Peptidasen, Carboxypeptidasen, α - und β -Glykosidasen, Lipasen, Phospholipasen, Phosphatasen, Phosphodiesterasen, Proteasen, Elastasen, Sulfatasen, Reduktasen und bakterielle Enzyme gespalten wird.
9. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I)
A und/oder B für einen Antikörper, deren Konjugate und Fragmente, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, natürliche oder synthetische Ribonukleinsäuren oder Desoxyribonukleinsäuren oder deren chemische Modifikationen, wie Aptamere oder Antisenseoligonukleotide, Lipoproteine, Lectine, Kohlenhydrate, Mono-, Di- oder Trisaccharide, lineare oder verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder -saccharidderivate oder für ein Dextran steht.
10. Verbindungen nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel (I) D für Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Polylysin oder Polylysindendrimere oder deren Derivate steht.
11. Verwendung von Verbindungen nach Anspruch 1 zur In-vivo-Diagnostik erkrankter Gewebebereiche mittels NIR-Strahlung sowie zur Therapie erkrankter Gewebebereiche.

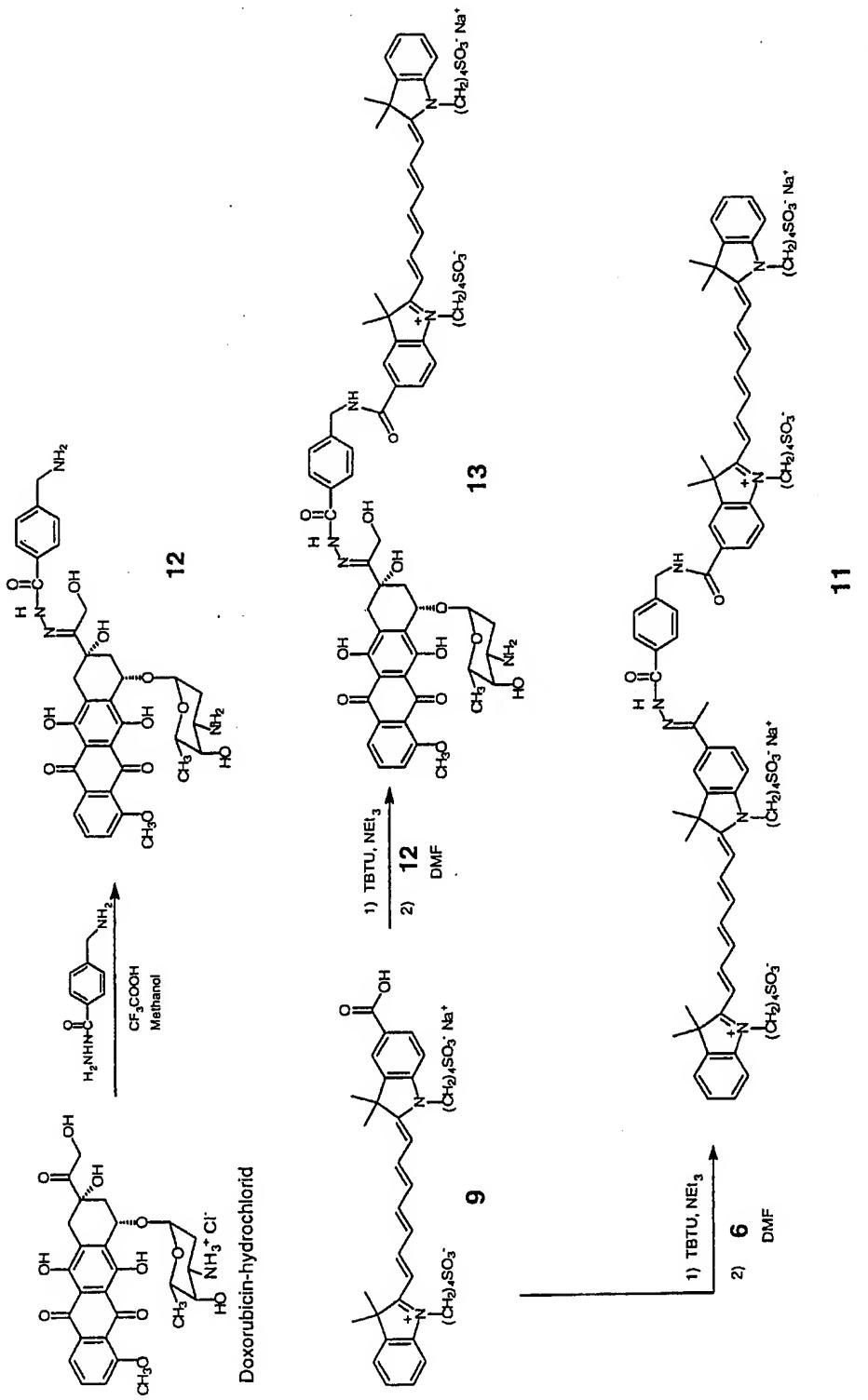
12. Optisches Diagnostikum zur In-vivo-Diagnostik
erkrankter Gewebebereiche mittels NIR-Strahlung, da-
durch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Verbin-
5 dung nach Anspruch 1 zusammen mit den üblichen Hilfs-
und /oder Trägerstoffen sowie Verdünnungsmitteln
enthält.

**Figur 1**



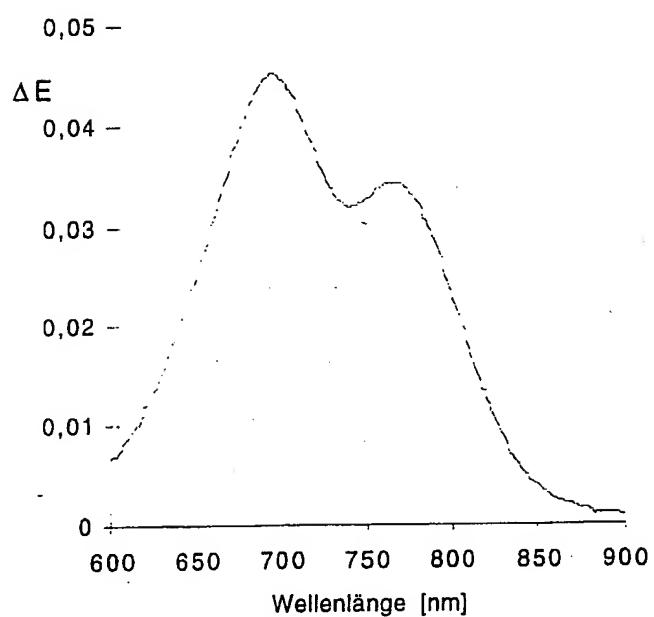
Figur 2

**Figure 3**



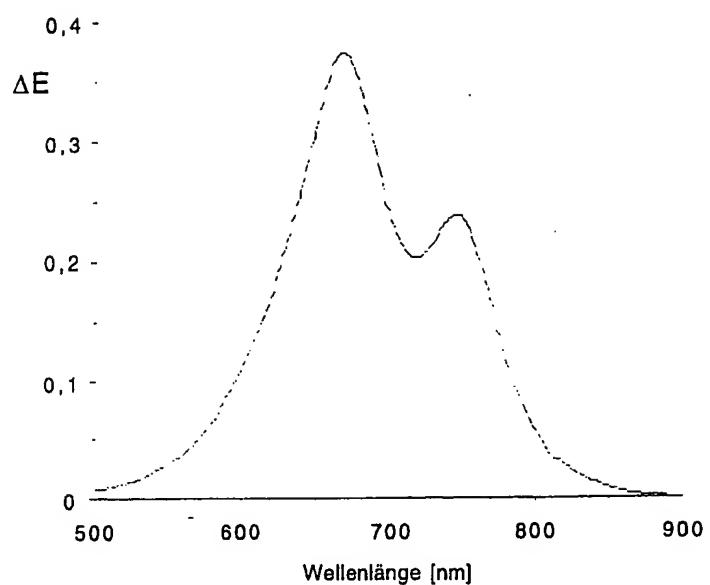
Figur 4

5 / 8

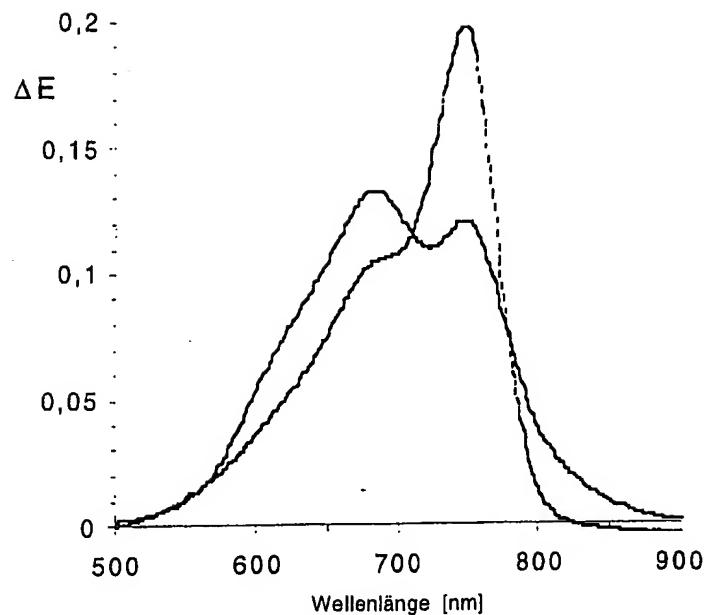


Figur 5 VIS/NIR-Absorptionspektrum von mAK9.2.27 / 4-Konjugat
(siehe Beispiel 4.1) in Phophatpuffer pH 7,8

6 / 8

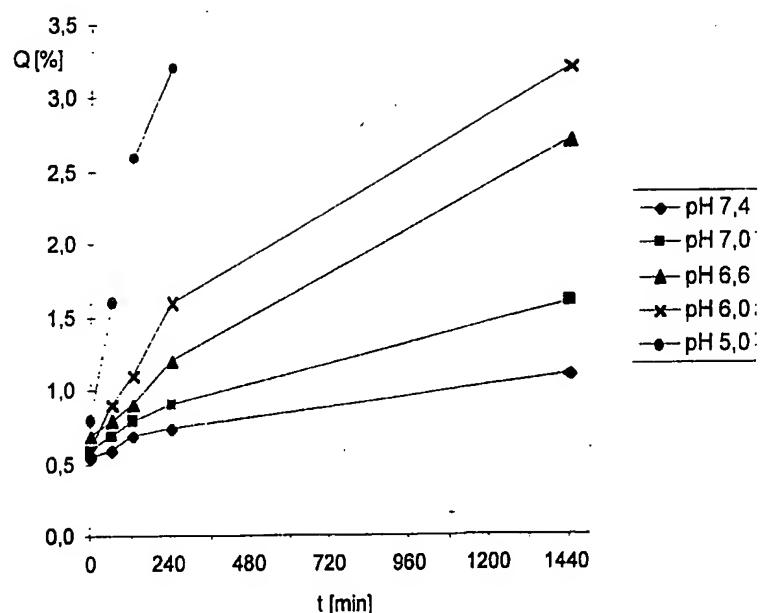


Figur 6 VIS/NIR-Absorptionspektrum **10** (siehe Beispiel 5.1),
 5 $\mu\text{mol/l}$ in Phosphatpuffer pH 8



Figur 7 VIS/NIR-Absorptionspektrum von 11
(siehe Beispiel 5.2),
Konzentration 4 $\mu\text{mol/l}$;
— in Phosphatpuffer pH 8,0;
--- in Phosphatpuffer pH 6,0 nach 24 h bei 37°C

8 / 8



Figur 8 Beobachtung der Spaltung des säurelabilen Dimers 11 anhand des Anstiegs Fluoreszenzquantenausbeute bei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit von der Zeit (siehe Beispiel 6).